

Enzymatic reduction of ketone groups in 6-cyano-3,5-dihydroxy-hexanoic alkyl ester

Patent Number: [US6001615](#)

Publication date: 1999-12-14

Inventor(s): REEVE CHRISTOPHER DAVID (GB)

Applicant(s): ZENECA LTD (GB)

Requested Patent: [WO9700968](#)

Application

Number: US19970981731 19971223

Priority Number

(s): GB19950012837 19950623; WO1996GB01422 19960617

IPC Classification: C12P13/00

EC Classification: [C12P13/00, C12P41/00B](#)

Equivalents: AU6230696, CA2221800, CZ9704129, DE69626820D, [EP0833938](#)
(WO9700968), [B1](#), JP11507204T

Abstract

PCT No. PCT/GB96/01422 Sec. 371 Date Dec. 23, 1997 Sec. 102(e) Date Dec. 23, 1997 PCT Filed Jun. 17, 1996 PCT Pub. No. WO97/00968 PCT Pub. Date Jan. 9, 1997A compound of formula (III) is produced by selectively reducing a compound of formula (II) using a reductase possessing the properties of one produced by Beauveria, Candida, Kluyveromyces, Torulaspora or Pichia. or A compound of formula is produced by selectively reducing a compound of formula II using a reductase possessing the properties of one produced by Candida pelliculosa, Neurospora crassa, Pichia trehalophila or preferably Hansenula anomola.

Data supplied from the esp@cenet database -I2

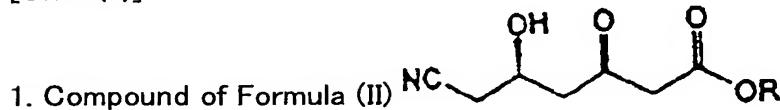
* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

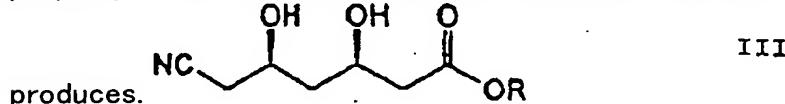
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]



It is the compound of a formula (III) by returning alternatively using the reductase which has the property of the reductase which ***, Beauveria, Candida, Kluyveromyces, Torulaspora, or Pichia



How to *****.

Compound of Formula (II) 2. Beauveria Bassiana, Pichia pastoris, Pichia haplophila, Pichia membranefaciens, Candida humicola, Candida solani, Candida diddensiae, Candida friedrichii, Kluyveromyces drosophilorum, The method according to claim 1 of manufacturing the compound of a formula (III) by returning alternatively using the reductase which has the property of the reductase which Torulaspora hansenii or Pichia angusta produces.

3. Method according to claim 1 or 2 by which reductase is obtained from Beauveria, Candida, Kluyveromyces, Torulaspora, or Pichia.

4. Way of claim 1-3 given in any 1 term reductase is supplied by existence of all cells of Beauveria, Candida, Kluyveromyces, Torulaspora, or Pichia on the occasion of alternative reduction.

5. Way of claim 1-4 given in any 1 term reductase is what Pichia produces.

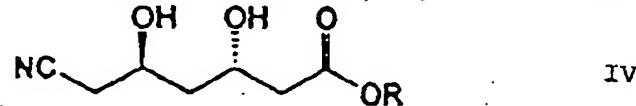
6. Way according to claim 5 reductase is what Pichia haplophila or Pichia angusta produces.

7. Method of claim 1-6 given in any 1 term carried out in nutrition culture medium which contains carbon source for this organism under existence of all cells of organism which produces aforementioned reductase.

8. Way according to claim 7 trace element exists in nitrogen source and source row of Lynn.

9. Method according to claim 7 or 8 enforced under aerobic conditions.

10. It is Formula by Returning Compound of Formula (III) Alternatively Using Candida Pelliculosa, Neurospora Crassa, Pichia Trehalophila, or Reductase that Has Property of Reductase Which Hansenula Anomala Produces Preferably.



How to manufacture *****.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

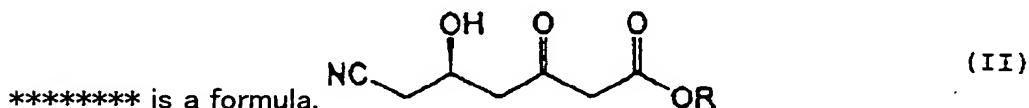
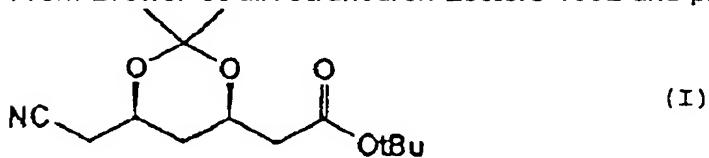
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Reduction of a ketone group this invention relates to reduction of a ketone group.

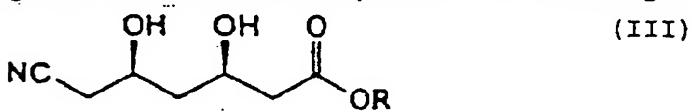
From Brower et al. Tetrahedron Letters 1992 and p.2279-2282 to a formula



***** is a formula.

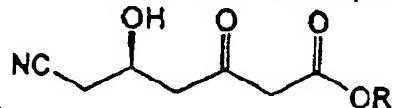
Manufacturing by returning to a JIASUTEREO selection target and subsequently protecting ***** as acetonide by the method of Chen et al. Tetrahedron Letters 1987 28 155 and Chem Lett 19871923, is known. Obtaining a compound (I) by the intersection air conditioner IZEN method was also reported. These paths adopt the temperature of -90 degrees C, and, for this reason, those methods have become the inconvenient thing which cost requires.

A compound (I) is human menopausal gonadotrophin to which the cholesterol in whole plasma and a low density lipoprotein is reduced in CI-981, i.e., Homo sapiens. It can be used as intermediate field in composition of the CoA reductase inhibitor. The vital structures can be guided also from the compound of the following formula.



the above-mentioned formula -- setting -- R -- an alkyl group and the thing which has 1-6 carbon atoms preferably -- it is t-butyl more preferably

This invention persons found out that a compound (II) was returned in the convenient temperature which is a degree or high selectivity in the middle, and a compound (III) could be manufactured, when the ketone reductase generally seen between the strains of Beauveria, Pichia, Candida, Kluyveromyces, and a Torulaspora group was used. However, an exception may arise in each kind or an enzyme may be accompanied by one of the reverse stereospecificity.



Therefore, this invention is the compound of a formula (II).

Beauveria bassiana ** and Beauveria -- preferably Or it membranefaciens(es). Pichia -- desirable -- Pichia pastoris and haplophila -- It Candida humicola and solani(s). Candida -- preferably diddensiae or friedrichii, Kluyveromyces, Preferably Kluyveromyces drosophilae, Torulaspora hansenii or Torulaspora -- preferably By returning alternatively using the reductase

which has the property of the reductase which the microorganism preferably chosen from Pichia angusta produces, it includes manufacturing the compound of a formula (III).

Beauveria bassiana moreover, this invention — the compound of a formula (II) — the aforementioned microorganism — preferably Pichia pastoris, Pichia haplophila, Pichia membranefaciens, Candida humicola, Candida solani, Candida diddensiae, Candida friedrichii, Kluyveromyces drosophilarum, Torulaspora hansenii or by returning alternatively using all the cells or extract of Pichia angusta preferably, it is a formula (III).

It includes manufacturing *****.

this invention is preferably carried out using all the cells of an organism. It is because it becomes unnecessary to separate the purpose enzyme and a cofactor required for a reaction is supplied by this.

Although each above-mentioned kind can be used, in order to obtain a high invert ratio and high selectivity, it is desirable Pichia haplophila and to use the enzyme or all the cells of Pichia angusta more preferably.

Generally a cofactor and the system for usually reproducing nicotinamide-adenine-dinucleotide (P) H (a nicotinamide adenine dinucleotide or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) and a cofactor, for example, a glucose, and the glucose dehydrogenase are used with an enzyme for guidance of a reaction. Since a cofactor suitable in [all] a cell and a reduction mechanism exist, it is desirable to use all the cells in the nutrition culture medium containing a desirable suitable carbon source. :sugar with which 1 or more than it is contained in a carbon source among the following, for example, a maltose, and a sucrose -- or -- desirable -- a glucose, a polyol, for example, a glycerol, or a sorbitol, a citric acid, a lower alcohol, for example, a methanol, or ethanol

A trace element must exist in a nitrogen source and the source row of Lynn in a culture medium to increase all cells in a reaction. These may be ordinarily used for cultivation of a living thing. This method can be enforced by adding the compound of Formula II to the culture of the living thing increased in the culture medium which can support multiplication, or the viable cell suspension in the culture medium lacked more than in one or it of a nutrient required for multiplication although the carbon source was contained preferably. A death cell can also be used as long as a required enzyme and a required cofactor exist. As long as it is required, you may add them into a death cell.

A cell may be fixed in a base material by request, and this may be contacted to the compound of Formula II under desirable existence of the aforementioned suitable carbon source.

pH — 3.5—9, 4—9, — desirable — a maximum of 6.5 — a maximum of 5.5 is more preferably suitable [for example,] It is very suitable to use pH of 4—5. Probably, it will be preferably suitable for this method more preferably to carry [10—50-degree C / 20—40-degree C] out at the temperature of 25—35 degrees C. When all the survival cells of the aforementioned living thing exist, it is desirable to operate it under aerobic conditions. a remarkable change is possible although it is suitable to measure with standard temperature and standard pressure, and to use the oxygen aeration speed of per minute 0.01 to 1.0 capacity under the above-mentioned pH and the conditions of temperature per capacity of a culture medium — obvious — it will be . You may supply oxygen as air. When performing this separately from this method, on the occasion of multiplication of a living thing, same pH, temperature, and aeration conditions can be adopted.

The refined enzyme can be isolated with a known means. the ion exchange chromatography which carries out centrifugal separation of the suspension of the destroyed cell suitably, and separates a transparent solution from cell waste, for example, elutes the ion concentration of a liquid from a column with slight height suitably — and/or, the alternative precipitation by addition of the ionicity matter, for example, an ammonium sulfate, separates the enzyme made into the purpose from this solution In order to raise purity, you may repeat such operation by request. Manufacture of the compound of example 1 formula (III) 41g yeast and the agar for mold were dissolved in distilled water of 1L, and the microorganism was maintained on YM (oxo id company) agar plate prepared by sterilizing with an autoclave.

In the flask with a baffle of 1L which put in 200ml of mineral salts culture media of the following composition for proliferation in a liquid medium :(per [1L]) K2HPO4 (1.9g) which transplanted

the microbial cell of one loop (loopful) in sterile from the agar plate, NaH₂PO₄.2H₂O (2.02g), 2(NH₄)₂SO₄ (1.8g), MgSO₄.7H₂O (0.2g), FeCl₃ (0.97mg), and a trace element solution (1ml). The trace element solution consisted of CuSO₄(per [1L]) 4.5H₂O (0.02g), MnSO₄.4H₂O (0.1g), ZnSO₄.7H₂O (0.1g), and CaCO₃ (1.8g). This minimal medium was supplemented with 0.2% (w/v) of yeast extract, and 2.25% (w/v) of glucose.

The microorganism was proliferated in 150rpm for 24 to 48 hours with the orbital shaker at 28 degrees C.

The microbial cell was harvested by carrying out at-long-intervals heart separation in 7000rpm for 20 minutes at 10 degrees C. This cell pellet was re-suspended in 100ml 50mM sodium-sulfate buffer solution (pH 6.4), and the cell was washed by carrying out centrifugal separation according to the above. Finally this cell pellet was re-suspended in the 50ml above-mentioned buffer solution.

The compound (2 g/L) of a glucose (10 g/L) and a formula (II) was added to 50ml of cell suspension in a 250ml flask with a baffle. The cell was incubated in 150rpm on the rotary shaker for 18 to 48 hours at 28 degrees C.

The ethyl acetate of 1 capacity extracted the whole reaction broth twice. In many cases, the emulsion generated and this was destroyed by carrying out at-long-intervals heart separation in 10,000rpm for 5 minutes at 28 degrees C. The pooled ethyl-acetate extract was dried by anhydrous sodium sulfate, vacuum distillation removed the solvent, and the golden oil was obtained.

Enantiomer composition of a compound to the grade of conversion to the compound of Formula III and the compound of Formula III of Formula II was measured by HPLC (high pressure liquid chromatography). : which shows the conditions of HPLC below -- HPLC : Waters (Waters) 590 programmable pump column : "Chiralcel (Chiralcel)" OJ (250mmx4.6mm)

(KIRASERU is trademark) of Diamond Cell Chemical Industries. A guard column (50mmx4.6mm), grain-size solvent of 10 micrometers : Hexane: Ethanol (95:5)

The rate of flow It is temperature by :1ml/. : Ambient-temperature detection : A refractive index, Waters differential refractometer R401 The holding times of IV which is the diastereoisomer of the compound of Formula II and Formula III and the compound of Formula III were 43, 27, and 21 minutes, respectively.

The obtained result is summarized in Table 1.

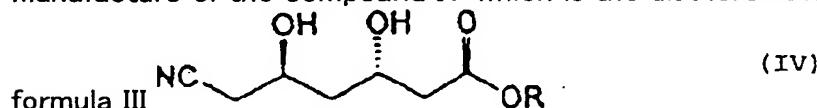
表 1

微生物	転化率 (%)	化合物III : IVの比率
Beauveria bassiana ATCC 7159	34	17:1
Candida humicola CBS 1897	8	> 20:1*
Candida diddensiae ATCC 20213	2	> 20:1*
Candida friedrichii ATCC 22970	3	> 20:1*
Candida solani CBS 1908	7	12:1
Hansenula nonfermentans CBS5764	75	1.8:1
Kluyveromyces drosophilae CBS 2105	5	6:1
Pichia angusta NCYC 495	100	110:1
Pichia angusta NCYC R320*	98	>100:1*
Pichia angusta NCYC R322*	98	>100:1*
Pichia haplophila CBS 2028	97	33:1
Pichia membranefaciens DSM 70366	4	>20:1*
Pichia pastoris BPCC 260	20	>20:1*
Pichia pastoris BPCC 443	17	>20:1*
Pichia pastoris NCYC R321*	20	>20:1*
Torulaspora hansenii ATCC 20220	17	>20:1*

* 化合物IVは検出されなかった。化合物IVの検出限界を基準とした結果。

+ ブダペスト条約の規定に基づいて1995年5月18日に寄託。

Manufacture of the compound IV which is the diastereoisomer of the compound of example 2



The microorganism was maintained and proliferated according to the publication of an example 1. A bioenergetic exchange and analysis were also performed completely similarly to the publication of an example 1.

A result is summarized in Table 2.

表 2

微生物	転化率 (%)	化合物V: IIIの比率
Candida pelliculosa ATCC 2149	98	9:1
Hansenula anomola CBS 2230	85	37:1
Neurospora crassa ATCC 9277	58	10:1
Pichia trehalophila CBS 5361	65	3:1

Probably, the above result shows that the specific bacillus belonging to a Candida group and each Pichia group produces both diastereoisomers. On the other hand, on Pichia angusta and another side, that singularity is shown to the diastereoisomer from which Hansenula anomola differs may show that two kinds of enzymes with opposite stereospecificity exist, and it may both attain to a certain kind, and/, or the enzyme besides a low of stereospecificity may exist. Multiplication of Pichia angusta NCYC R320 within example 3 fermenter, and in situ manufacture of the compound of a formula (III) (R=t-butyl) About Pichia angusta NCYC R320, it is the Brown biotechnology stat (Braun Biostat).

It was made to increase within 5L fermenter of ED/ER5 by both the batch culture and the supply formula batch culture (fed-batchculture).

Multiplication in a batch culture was performed in culture-medium 5L of the following composition. : (per [1L])

A glucose, 40g;MgSO4.7H2O, 1.2 g;K2SO4, 0.21 g;KH2PO4, 0.69 g;H3PO4 (17M), 1ml; yeast self-melt, 2g;FeSO4.7H2O, 0.05g; polypropylene-glycol defoaming agent, 0.3ml; a trace element solution, 2ml. A trace element solution contains ZnSO(per [1L]) 4.7H2O, 10g;MnSO4.4H2O, 10g;CuSO4.5H2O, 1g and H3PO4 (11.6M), and 1ml. The culture medium was prepared in tap water. 7M The culture medium was adjusted and controlled by addition of NH4OH for the purpose pH.

Although multiplication in a supply formula batch culture was performed according to what was indicated per batch culture however, when glucose concentration falls to less than 10 g/L The fermentation broth of 1L is taken out in sterile. Although maintained to 2 - 5 g/L, glucose concentration : (per [1L]) which supplied culture-medium 1L of the following composition at sufficient speed -- a glucose, 240g; yeast self-melt, 7g;FeSO4.7H2O, 0.175g; polypropylene-glycol defoaming agent, 1ml and a trace element solution, and 7ml

As for the fermentation performed under the batch culture and the supply formula batch culture, both were started by addition of Pichia angusta NCYC R320 inoculum. The inoculum was prepared in 200ml of mineral salts culture media indicated in the example 1, and was proliferated in 150rpm for 18 to 20 hours with the orbital shaker at 28 degrees C. Before inoculating a fermenter, the inoculum was diluted 10 times in the sterile culture medium of the same composition.

Fermentation is :temperature performed under the following pH, temperature, aeration, and churning conditions until it became the dryness cell weight 10 - 15 g/L : 28, 34 or 40-degree-CpH : 4.5, 5.5, 6.5 aeration : 0.1, 1.0vvm (a part for capacity [of the capacity/culture medium of air]/)

Churning :600rpm Production of the compound of a formula (III) (R=t-butyl) was started by

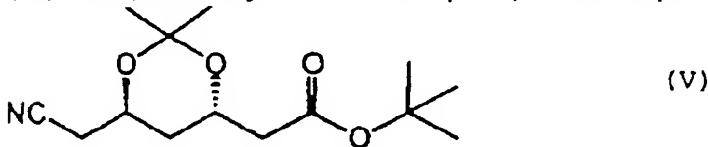
adding the compound of Formula II (R=t-butyl) as a crude oil (the remainder being acetoacetic-acid t-butyl substantially) of about 65% w/w of concentration. The compound of a formula (II) and (R=t-butyl) was added as a continuation feed stock at sufficient speed to maintain the concentration to 2 g/L preferably one to 5 g/L generally. By making a solid-state glucose into an auxiliary substrate, it added to fermentation broth so that the concentration of 1 - 5 g/L might be maintained. In each experiment, production of the compound of a formula (III) (R=t-butyl) was performed under the same temperature as the case of the proliferation stage of a microorganism, pH, aeration, and churning conditions.

The concentration of the compound of the formula in fermentation broth (II) (R=t-butyl) and a formula (III) (R=t-butyl) was measured by Antiphase HPLC : which indicates HPLC conditions below -- HPLC : Hewlett Packard HP 1050 columns : Waters, Novapak (Nova-PakR) C18 column, a size (3. 9x300mm), and grain size of 4 micrometers. Novapak is Millipore Corp. It is a registered trademark.

solvent : -- water: -- the 0.02M phosphoric-acid rate of flow in an acetonitrile (60:40) : a part for 1ml/ -- detector : Hewlett Packard HP 1047A refractive-index detector temperature : Ambient temperature a formula (II) (R=t-butyl) -- and (III) (R=t-butyl) the holding times of a compound were 4.0 and 3.1 minutes, respectively

When the living thing reduction process was completed, in 5000rpm, centrifugal separation of the fermentation broth was carried out for 20 minutes at 20-22 degrees C. The compound of a formula (III) (R=t-butyl) was isolated from the supernatant liquid the suitable organic solvent, for example, toluene, an isoamyl acetate, 2-pentanone, ethyl acetate or a 4-methyl-2-pentanone, and by extracting by ethyl acetate or 2-pentanone preferably. Solvent extraction liquid was dried by anhydrous sodium sulfate, vacuum distillation removed the solvent, and the rough product of Formula III (R=t-butyl) was obtained as a golden oil.

The isopropylidene derivative (I) which measures by HPLC of a rough product by the method which indicated the compound of a formula (III) (R=t-butyl), and the ratio of the diastereoisomer (IV) and (R=t-butyl) in the example 1, or corresponds, and its diastereoisomer (V) :



: measured by carrying out HPLC measurement of the ***** under the following conditions -- HPLC : Hewlett Packard HP 1050 columns : YMC ODS AQ303 The size of 4.6x250mm, and grain Degree of 5 micrometers. It can receive from a hike ROM (Hichrom) company.

solvent :methanol: -- water (50:50)

The rate of flow It is a detector by :1ml/. : Hewlett Packard HP 1047A refractive-index detector temperature : Ambient temperature The holding times of the compound of a formula (I) and a formula (V) were 31.0 minutes and 35.5 minutes, respectively.

Manufacture of an example 4 isopropylidene derivative (I) and its diastereoisomer (V) The sample of the rough product obtained by living thing reduction of the compound of a formula (III) (R=t-butyl), a formula (IV), and (R=t-butyl) and the compound of a formula (II) and (R=t-butyl) was changed into the isopropylidene derivative corresponding to the bottom of existence of the methansulfonic acid for catalysts by the reaction with 2 and 2-dimethoxypropane in the dryness acetone. 3g of rough products obtained by living thing reduction was made to react with 2 and 2-dimethoxypropane (7ml) with ambient temperature into the dryness acetone (5ml) containing methansulfonic acid (5microl) at a typical reaction for 2 hours. Subsequently, this solution was poured into w/v sodium-hydrogencarbonate solution 2 15ml%, and was agitated for 5 more minutes. 30ml ethyl acetate extracted the obtained mixture. The ethyl-acetate extract was separated, it mixed with 15ml n-hexane and 30ml distilled water washed the organic extract with which it mixed. The organic phase was dried by anhydrous sodium sulfate, vacuum distillation removed the solvent, and the oil of deep orange was obtained. This was solidified when it cooled.

The formula in pH, temperature, aeration conditions, and a fermentation method an example 5 – 13 various (III) (R=t-butyl)

Manufacture of ***** In each case, Pichia angusta NCYC R320 is used for examples 5–13 by the initial dryness cell weight of 10 – 15 g/L, and they show operation of the method of manufacturing the compound of a formula (III) (R=t-butyl) from the compound of a formula (II) and (R=t-butyl). This method was enforced according to the publication of an example 3 except the point shown in Table 3.

The result which operated this method under the conditions shown in Table 3 is summarized in Table 4.

The reaction profile obtained by operating this method under the conditions explained in full detail in the example 13 is shown in drawing 1. The initial dryness cell weight in this case was 12.67 g/L

表 3

実施例	p H	温 度 (°C)	通気 (VV M)	補給式バッチ/ バッチ培養
5	5.5	28	1	バッチ
6	5.5	34	1	バッチ
7	5.5	40	1	バッチ
8	5.5	28	0.1	バッチ
9	6.5	28	1	バッチ
10	4.5	28	1	バッチ
11	4.5	34	1	バッチ
12	5.5	28	1	補給式バッチ
13	4.5	28	1	補給式バッチ

V V Mは、空気の容量（標準温度および標準圧力で測定）／培地の容量／分を意味する。

表 4

実施例	反応時間 (時間)	(III)から (III)への 転化率(%)	(III)から(IVI) の還元の比速度 (g L ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹)	(IVI)の濃度 (g/L)	単離した (IV)の 収率(%)	(IV):(V) の比率、
5	44	85	0.022	12.3	87	>166:1
6	22	83	0.027	2.62	ND	> 64:1
7	47	57	0.052	6.1	85	> 86:1
8	52	71	0.025	7.1	88	> 71:1
9	24	79	0.032	4.65	ND	> 85:1
10	49	93	0.015	11.3	84	>110:1
11	25.5	ND	0.018	1.98	ND	> 63:1
12	41	84	0.037	10.95	84	> 92:1
13	48	79	0.030	16.96	91	>172:1

* 化合物(V)は、調製したいずれの試料中にも検出されなかった。結果は化合物(V)の検出限界を基準として、実施例3に記載したHPLC条件を用いて算出された。

ND 測定されなかった。

Elucidation of the compound of example 14 formula (III) (R=t-butyl) The rough product (III) (R=t-butyl) obtained by operation of the method indicated in the example 5 was changed into the isopropylidene derivative (I) by the following methods.

The rough product (III (145g; 65g and 0.28 mols) is contained) was inserted in the round bottom flask of 1L equipped with the magnetic stirrer. Dryness acetone (200ml), 2, and 2-dimethoxypropane (294ml, 2.39 mols) and methansulfonic acid (1.5ml) were added in this flask. By carrying out the spot of a small amount of sample to damp pH directions piece of paper, pH of a

solution was inspected and it checked that it was acid. Reaction mixture was agitated with ambient temperature and disappearance of (III) was supervised by HPLC using the method indicated in the example 3. It completed in 3 hours and the reaction added w/v sodium-hydrogencarbonate solution 2 550ml% at this time. pH was rechecked according to the above and it checked that it was within the limits of 7-9. Mixture was moved to the separating funnel and 400ml ethyl acetate extracted. Ethyl acetate was removed and 200 moreml ethyl acetate re-extracted the aqueous phase. The ethyl-acetate extract was doubled and n-hexane of 1L was added. Distilled water of 1L washed this set ethyl acetate and the solution of a hexane 3 times, the organic phase was separated, and it was made to dry by anhydrous sodium sulfate. When vacuum distillation removed the solvent, the red oil was obtained, and when this left it, it was solidified.

This isopropylidene (I) was crystallized from n-hexane, it recrystallized [heptane / n-], and the white crystalline-substance product was obtained with 81% of yield. this isopropylidene (I) -- 98.65% of chemical purity -- it is -- a compound (II) -- and (III) (V) -- (R=t-butyl) is not contained but they are an infrared spectroscopy and 250MHz. 1H It was undistinguishable from the authentic sample of (I) with neither of NMR spectrometry.

Reference: ATCC American type culture collection, 123031 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USACBS Central bureau Ball Singh Mel cull CHAZU, Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, NetherlandDSM DOITCHU sum RUNGU phon micro ORUGA varnish noodle UNTO - A TSUERUKARUCHU allene company, Mascheroder Weg 1b, D-330 Braunschweig, GermanyNCYC National collection OBU yeast cull CHAZU INSUTE An ICHUTO OBU hood research, a NORUWIHHI laboratory, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UABPCC Zeneka Co., bioproducts culture collection (generally it cannot receive)

[Translation done.]

*** NOTICES ***

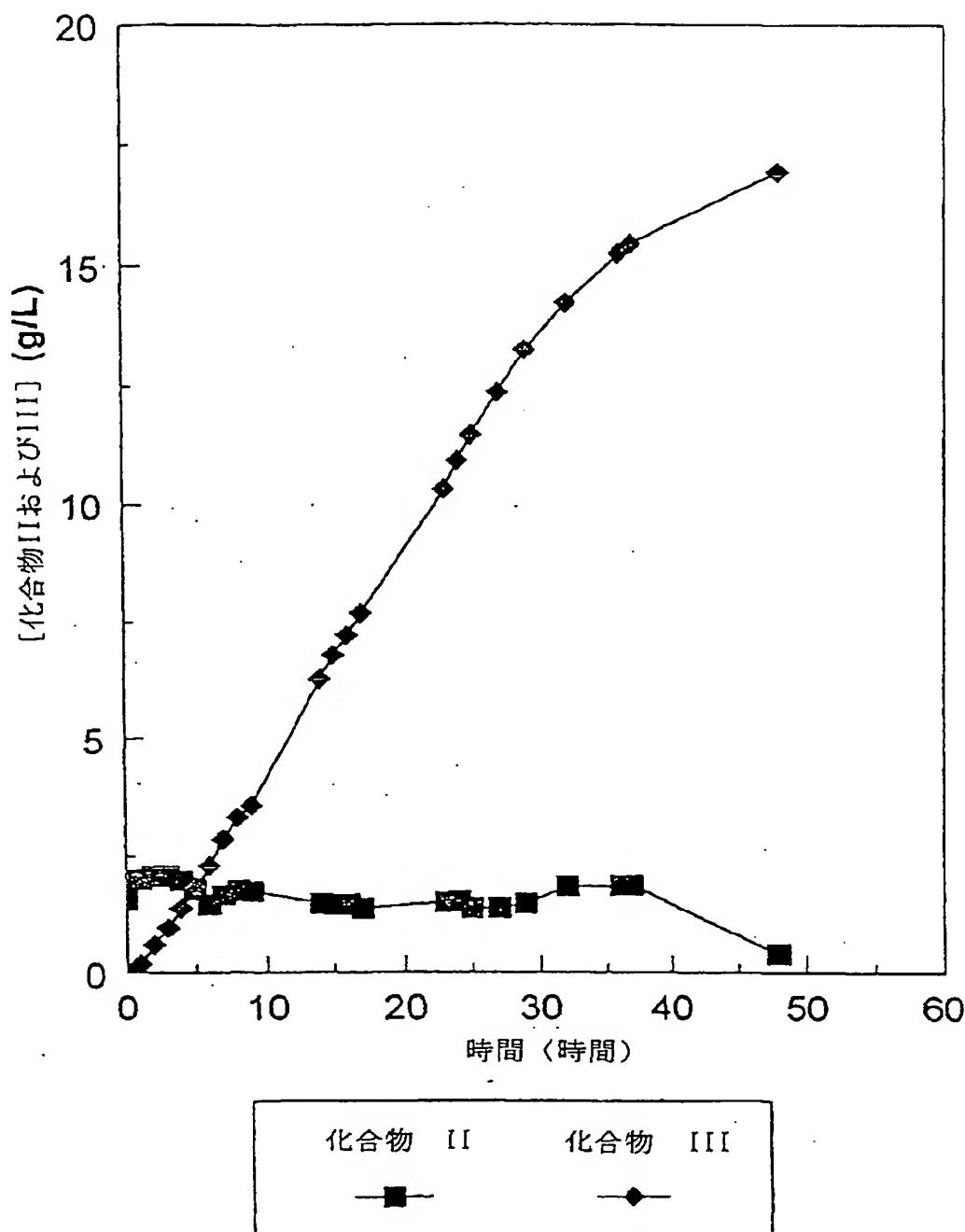
Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing_1]

FIGURE 1 of 1



[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-507204

(43)公表日 平成11年(1999)6月29日

(51)Int.Cl.⁸

C 12 P 13/00

識別記号

F I

C 12 P 13/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21)出願番号 特願平8-532013
(86) (22)出願日 平成8年(1996)6月17日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)12月18日
(86)国際出願番号 PCT/GB96/01422
(87)国際公開番号 WO97/00968
(87)国際公開日 平成9年(1997)1月9日
(31)優先権主張番号 9512837.7
(32)優先日 1995年6月23日
(33)優先権主張国 イギリス(GB)

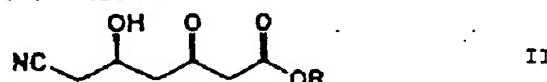
(71)出願人 ゼネカ・リミテッド
イギリス国 ロンドン ダブリュー1ワイ
6エルエヌ、スタンホープ ゲート 15
(72)発明者 リーヴ、クリストファー・ディヴィッド
イギリス国ミドルズブロー ティーエス9
6イーアール、グレイト・アイトン、ロ
ーズベリー・クレセント 28
(74)代理人 弁理士 社本 一夫(外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ケトン基の還元

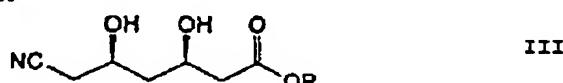
(57)【要約】

式 (II) の化合物

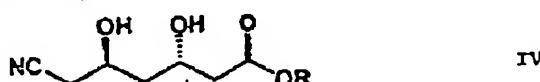


の化合物が製造される。

を、Beauveria、Candida、Kluyveromyces、TorulasporaまたはPichliaが产生する還元酵素の特性を有する還元酵素を用いて選択的に還元することにより、式(III)の化合物

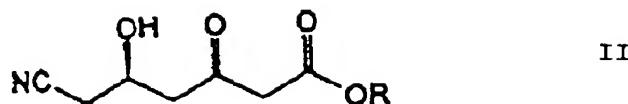


が製造される。あるいは式IIの化合物を、Candida pell
iculosa、Neurospora crassa、Pichiatriehalophila、ま
たは好ましくはHansenula anomolaが产生する還元酵素
の特性を有する還元酵素を用いて選択的に還元すること
により、式

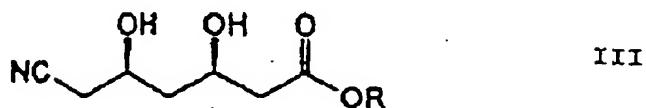


【特許請求の範囲】

1. 式 (II) の化合物



を、Beauveria、Candida、Kluyveromyces、TorulasporaまたはPichiaが产生する還元酵素の特性を有する還元酵素を用いて選択的に還元することにより、式(III)の化合物



を製造する方法。

2. 式 (II) の化合物を、Beauveria bassiana、Pichia pastoris、Pichia haplophila、Pichia membranefaciens、Candida humicola、Candida solani、Candida diddensiae、Candida friedrichii、Kluyveromyces drosophilicola、Torulaspora hanseniiまたはPichia angustaが产生する還元酵素の特性を有する還元酵素を用いて選択的に還元することにより式 (III) の化合物を製造する、請求項 1 記載の方法。

3. 還元酵素がBeauveria、Candida、Kluyveromyces、TorulasporaまたはPichiaから得られる、請求項 1 または 2 記載の方法。

4. 選択的還元に際して、還元酵素がBeauveria、Candida、Kluyveromyces、TorulasporaまたはPichiaの全細胞の存在により供給される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

5. 還元酵素がPichiaの产生するものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

6. 還元酵素がPichia haplophilaまたはPichia angustaの产生するものである、請求項 5 記載の方法。

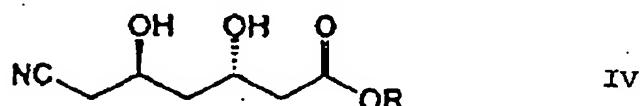
7. 前記還元酵素を产生する生物の全細胞の存在下に、該生物のための炭素源

を含有する栄養培地中で実施される、請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の方法。

8. 窒素源およびリン源ならびに微量元素が存在する、請求項 7 記載の方法。

9. 好気性条件下で実施される、請求項 7 または 8 記載の方法。

10. 式 (III) の化合物を、Candida pelliculosa、Neurospora crassa、Pichia trehalophila、または好ましくはHansenula anomolaが產生する還元酵素の特性を有する還元酵素を用いて選択的に還元することにより、式



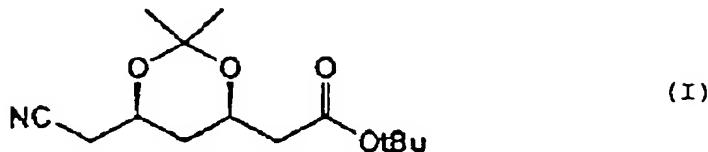
の化合物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

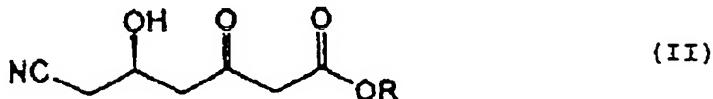
ケトン基の還元

本発明はケトン基の還元に関する。

Brower et al. *Tetrahedron Letters* 1992, p. 2279-2282から、式

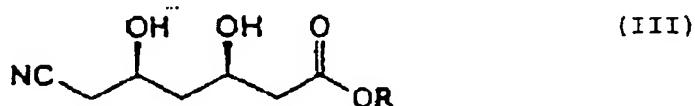


の化合物が、式



の化合物を Chen et al. *Tetrahedron Letters* 1987 28 155および *Chem Lett* 1987 1923の方法でジアステレオ選択的に還元し、次いでアセトニドとして保護することにより製造することは知られている。交差クライゼン法により化合物 (I) を得ることも報告された。これらの経路は-90℃の温度を採用し、このためそれらの方法は経費のかかる不便なものとなっている。

化合物 (I) は C I - 981、すなわちヒトにおいて全血漿中および低密度リポタンパク質中のコレステロールを低下させる H M G C o A 還元酵素阻害薬の合成における中間体として使用できる。その重要な構造は次式の化合物からも誘導できる。

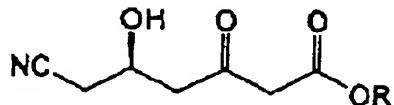


上記式において、Rはアルキル基、好ましくは1~6個の炭素原子をもつもの、より好ましくはt-ブチル基である。

本発明者らは、*Beauveria*、*Pichia*、*Candida*、*Kluyveromyces*および*Torulaspo*
*ra*属の菌種間に一般に見られるケトン還元酵素を用いると、化合物 (II) を中程

度ないし高い選択率で、かつ好都合な温度において還元して化合物(III)を製造しうることを見出した。ただしそれぞれの種において例外が生じることがあり、または酵素が逆の立体特異性のひとつを伴う可能性がある。

したがって本発明は、式(II)の化合物



を、Beauveria、好ましくはBeauveria bassiana、Pichia、好ましくはPichia pastoris、haplophilaまたはmembranefaciens、Candida、好ましくはCandida humicola、solani、diddensiaeまたはfriedrichii、Kluyveromyces、好ましくはKluyveromyces drosophilicarum、またはTorulaspora、好ましくはTorulaspora hanseii、好ましくはPichia angustaから選択される微生物が產生する還元酵素の特性を有する還元酵素を用いて選択的に還元することにより、式(III)の化合物を製造することを包含する。

また本発明は、式(II)の化合物を、前記の微生物、好ましくはBeauveria bassiana、Pichia pastoris、Pichia haplophila、Pichia membranefaciens、Candida humicola、Candida solani、Candida diddensiae、Candida friedrichii、Kluyveromyces drosophilicarum、Torulaspora hanseiiまたは好ましくはPichia angustaの全細胞または抽出物を用いて選択的に還元することにより、式(III)の化合物を製造することを包含する。

本発明は好ましくは生物の全細胞を用いて実施される。これにより、目的酵素を分離する必要がなくなり、反応に必要な補因子が供給されるからである。

上記の種をいずれも使用できるが、高い転化率および高い選択性を得るためにPichia haplophila、より好ましくはPichia angustaの酵素または全細胞を用いることが好ましい。

一般に補因子、普通はNAD(P)H(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート)および補因子を再生するための系、たとえばグルコースおよびグルコースデヒドロゲナーゼを、反応の誘導のために酵素と共に用いる。全細胞中には好適な補因子および還元機構

が存在するので、好ましくは好適な炭素源を含有する栄養培地中の全細胞を用いるのが好ましい。炭素源には下記のうち1またはそれ以上が含まれる：糖、たとえばマルトース、スクロースまたは好ましくはグルコース、ポリオール、たとえばグリセリンもしくはソルビトール、クエン酸、または低級アルコール、たとえばメタノールもしくはエタノール。

全細胞を反応中に増殖させたい場合、窒素源およびリン源ならびに微量元素が培地中に存在しなければならない。これらは生物の培養に普通に用いられるものであつてよい。

本方法は、増殖を支持しうる培地中で増殖している生物の培養物に、または好ましくは炭素源を含有するが、増殖に必要な栄養素の1つまたはそれ以上を欠如した培地中の生細胞懸濁液に、式IIの化合物を添加することにより実施できる。死細胞も、必要な酵素および補因子が存在する限り使用できる。必要ならばそれらを死細胞に添加してもよい。

所望により細胞を支持体に固定化し、これを好ましくは前記の好適な炭素源の存在下で、式IIの化合物と接触させてもよい。

pHは3.5～9、たとえば4～9、好ましくは最高6.5、より好ましくは最高5.5が好適である。4～5のpHを用いるのがきわめて好適である。本方法は10～50℃、好ましくは20～40℃、より好ましくは25～35℃の温度で実施するのが好適であろう。前記生物の生存全細胞が存在する場合、好気性条件下で操作するのが好ましい。標準温度および標準圧力で測定して、培地の容量当たり毎分0.01～1.0容量の酸素通気速度を上記のpHおよび温度の条件下で用いるのが好適であるが、かなりの変更が可能であることは自明であろう。空気として酸素を供給してもよい。これを本方法と別個に行う場合にも、生物の増殖に際して同様なpH、温度および通気条件を採用できる。

精製した酵素は既知の手段で単離できる。好適には、破壊した細胞の懸濁液を遠心分離し、透明な溶液を細胞屑から分離し、たとえば好適には液体のイオン濃度を高めながらカラムから溶離するイオン交換クロマトグラフィーにより、および／またはイオン性物質、たとえば硫酸アンモニウムの添加による選択的沈殿により、この溶液から目的とする酵素を分離する。純度を高めるために、所望によ

りこのような操作を繰り返してもよい。

実施例 1

式 (III) の化合物の製造

4 1 g の酵母および糸状菌用寒天を 1 L の蒸留水に溶解し、オートクレーブで滅菌することにより調製した YM (オキソイド・カンパニー) 寒天平板上で微生物を維持した。

液体培地中での増殖のために、下記組成のミネラル塩類培地 2 0 0 m l を入れた 1 L のバフル付きフラスコに、寒天平板から 1 ループ (loopful) の微生物細胞を無菌的に移植した： (1 L 当たり) K₂HPO₄ (1.9 g) 、 NaH₂PO₄ 2 H₂O (2.02 g) 、 (NH₄)₂SO₄ (1.8 g) 、 MgSO₄ 7 H₂O (0.2 g) 、 FeCl₃ (0.97 mg) および微量元素溶液 (1 ml) 。微量元素溶液は (1 L 当たり) CuSO₄ 5 H₂O (0.02 g) 、 MnSO₄ 4 H₂O (0.1 g) 、 ZnSO₄ 7 H₂O (0.1 g) および CaCO₃ (1.8 g) からなっていた。この最小培地に 0.2% (w/v) の酵母エキスおよび 2.25% (w/v) のグルコースを補充した。

微生物を 28 °C でオービタルシェーカーにより 150 rpm において 24 ~ 48 時間増殖させた。

10 °C で 7000 rpm において 20 分間遠心分離することにより微生物細胞を収穫した。この細胞ペレットを 100 ml の 50 mM 硫酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.4) に再懸濁し、上記に従って遠心分離することにより細胞を洗浄した。この細胞ペレットを最終的に 50 ml の上記緩衝液に再懸濁した。

250 ml のバフル付きフラスコ内の細胞懸濁液 50 ml にグルコース (1.0 g/L) および式 (II) の化合物 (2 g/L) を添加した。細胞を 28 °C で回転振盪機上、150 rpm において 18 ~ 48 時間インキュベートした。

反応プロセス全体を 1 容量の酢酸エチルで 2 回抽出した。多くの場合、エマルションが生成し、これを 28 °C で 10,000 rpm において 5 分間遠心分離することにより破壊した。プールした酢酸エチル抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を真空蒸留により除去して、金色の油を得た。

式 I I の化合物から式 I I I の化合物への変換の程度および式 I I I の化合物の鏡像異性体組成を、H P L C（高圧液体クロマトグラフィー）により測定した。H P L C の条件を以下に示す：

H P L C : ウォーターズ (Waters) 590 プログラマブルポンプ

カラム : “キラルセル (Chiralcel)” O J (250 mm × 4.6 mm)

(キラセルはダイアセル・ケミカル・インダストリーズ社の商標)、

ガードカラム (50 mm × 4.6 mm) 付き、粒度 1.0 μm

溶剤 : ヘキサン：エタノール (95:5)

流速 : 1 ml / 分

温度 : 周囲温度

検出 : 屈折率、ウォーターズ示差屈折計 R 401

式 II、式 I I I の化合物、および式 I I I の化合物のジアステレオ異性体である I V の保持時間は、それぞれ 4.3、2.7 および 2.1 分であった。

得られた結果を表 1 にまとめる。

表 1

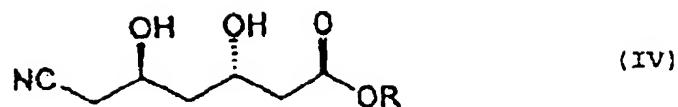
微生物	転化率 (%)	化合物III :IVの比率
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	34	17:1
<i>Candida humicola</i> CBS 1897	8	> 20:1*
<i>Candida diddensiae</i> ATCC 20213	2	> 20:1*
<i>Candida friedrichii</i> ATCC 22970	3	> 20:1*
<i>Candida solani</i> CBS 1908	7	12:1
<i>Hansenula nonfermentans</i> CBS5764	75	1.8:1
<i>Kluyveromyces drosophilicola</i> CBS 2105	5	6:1
<i>Pichia angusta</i> NCYC 495	100	110:1
<i>Pichia angusta</i> NCYC R320*	98	>100:1*
<i>Pichia angusta</i> NCYC R322*	98	>100:1*
<i>Pichia haplophila</i> CBS 2028	97	33:1
<i>Pichia membranefaciens</i> DSM 70366	4	>20:1*
<i>Pichia pastoris</i> BPCC 260	20	>20:1*
<i>Pichia pastoris</i> BPCC 443	17	>20:1*
<i>Pichia pastoris</i> NCYC R321*	20	>20:1*
<i>Torulaspora hansenii</i> ATCC 20220	17	>20:1*

* 化合物IVは検出されなかった。化合物IVの検出限界を基準とした結果。

+ ブダペスト条約の規定に基づいて1995年5月18日に寄託。

実施例 2

式IIIの化合物のジアステレオ異性体である化合物IVの製造



実施例 1 の記載に従って微生物を維持し、増殖させた。生物変換および分析も実施例 1 の記載と全く同じに行った。
結果を表 2 にまとめる。

表 2

微生物	転化率 (%)	化合物V: IIIの比率
<i>Candida pelliculosa</i> ATCC 2149	98	9:1
<i>Hansenula anomola</i> CBS 2230	85	37:1
<i>Neurospora crassa</i> ATCC 9277	58	10:1
<i>Pichia trehalophila</i> CBS 5361	65	3:1

以上の結果から、*Candida*属および*Pichia*属それぞれに属する特定の菌は両方のジアステレオ異性体を産生することが分かるであろう。一方ではたとえば*Pichia angusta*、他方では*Hansenula anomola*が異なるジアステレオ異性体に対して特異性を示すことは、反対の立体特異性をもつ 2 種類の酵素が存在することを示し、またある種には両方および／または立体特異性の低い他の酵素が存在する可能性がある。

実施例 3

発酵槽内での*Pichia angusta* N CYC R 320の増殖、および式 (III) ($R = t - \beta$ チル) の化合物の *in situ* 製造

Pichia angusta N CYC R 320を、ブラウン・バイオスター (Braun Biostat) E D / E R 5 の 5 L 発酵槽内でバッチ培養および補給式バッチ培養 (fed-batch)

ulture) の両方により増殖させた。

バッチ培養における増殖は下記組成の培地 5 L 中で行われた：(1 L当たり)
 グルコース，40 g；MgSO₄·7H₂O，1.2 g；K₂SO₄，0.21 g；KH₂PO₄，0.69 g；H₃PO₄(17 M)，1 ml；酵母自己溶解物，2 g；FeSO₄·7H₂O，0.05 g；ポリプロピレングリコール消泡剤，0.3 ml；微量元素溶液，2 ml。微量元素溶液は(1 L当たり)ZnSO₄·7H₂O，10 g；MnSO₄·4H₂O，10 g；CuSO₄·5H₂O，1 gおよびH₃PO₄(11.6 M)，1 mlを含む。培地を水道水中に調製した。7 M NH₄OHの添加により、培地を目的pHに調整および制御した。

補給式バッチ培養における増殖はバッチ培養につき記載したものに従って行ったが、ただしグルコース濃度が10 g/L未満に低下した場合には、1 Lの発酵プロセスを無菌的に取り出し、グルコース濃度を2～5 g/Lに維持するのに十分な速度で下記組成の培地1 Lを補給した：(1 L当たり)グルコース，240 g；酵母自己溶解物，7 g；FeSO₄·7H₂O，0.175 g；ポリプロピレングリコール消泡剤，1 mlおよび微量元素溶液，7 ml。

バッチ培養および補給式バッチ培養下で行った発酵は両方とも、Pichia angusta NCYC R320接種物の添加により開始された。接種物を、実施例1に記載したミネラル塩類培地200 ml中で調製し、28℃でオービタルシェーカーにより150 rpmにおいて18～20時間増殖させた。発酵槽に接種する前に、接種物を同一組成の無菌培地中に10倍希釈した。

発酵は下記のpH、温度、通気および搅拌条件下で、乾燥細胞重量1.0～1.5 g/Lになるまで行われた：

温度 : 28, 34, 40℃

pH : 4.5, 5.5, 6.5

通気 : 0.1, 1.0 vvm (空気の容量/培地の容量/分)

搅拌 : 600 rpm

式(III)(R=t-ブチル)の化合物の產生は、式II(R=t-ブチル)の

化合物を濃度約6.5% w/wの粗製の油(残部は実質的にアセト酢酸t-ブチル

) として添加することにより開始された。式 (II) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物は、その濃度を一般に 1 ~ 5 g / L、好ましくは 2 g / L に維持するのに十分な速度で連続供給物として添加された。固体グルコースを補助基質として、1 ~ 5 g / L の濃度を維持するように発酵プロスに添加した。各実験において式 (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物の產生は、微生物の増殖段階の場合と同じ温度、pH、通気および攪拌条件下で行われた。

発酵プロス中の式 (II) ($R = t - \text{ブチル}$) および式 (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物の濃度を、逆相 HPLC により測定した。HPLC 条件を以下に記載する：

HPLC : ヒューレット・パッカード HP 1050

カラム : ウォーターズ、ノバーパック (Nova-Pak[®]) C18 カラム、寸法 (3.9 × 300 mm) および粒度 4 μm 。ノバーパックはミリポア社の登録商標である。

溶剤 : 水 : アセトニトリル (60 : 40) 中の 0.02 M リン酸

流速 : 1 ml / 分

検出器 : ヒューレット・パッカード HP 1047A 屈折率検出器

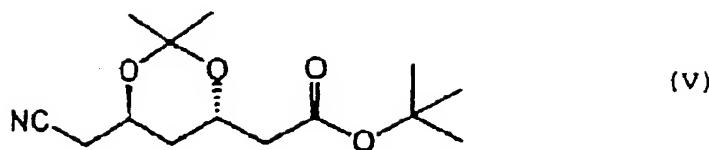
温度 : 周囲温度

式 (II) ($R = t - \text{ブチル}$) および (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物の保持時間は、それぞれ 4.0 および 3.1 分であった。

生物還元工程が完了した時点で、発酵プロスを 20 ~ 22 °C で 5000 rpm において 20 分間、遠心分離した。式 (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物を上清から好適な有機溶剤、たとえばトルエン、酢酸イソアミル、2-ペンタノン、酢酸エチルまたは 4-メチル-2-ペンタノン、好ましくは酢酸エチルまたは 2-ペンタノンで抽出することにより単離した。溶剤抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を真空蒸留により除去して、式 III ($R = t - \text{ブチル}$) の粗生成物を金色の油として得た。

式 (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物とそのジアステレオ異性体 (IV) ($R = t - \text{ブチル}$) の比率を実施例 1 に記載した方法で粗生成物の HPLC により測

定するか、または対応するイソプロピリデン誘導体（I）とそのジアステレオ異性体（V）：



の比率を下記の条件下でHPLC測定することにより測定した：

HPLC : ヒューレット・パッカード HP 1050

カラム : YMC ODS AQ303 寸法 4.6 × 250 mm および粒度 5 μm。ハイクロム (Hichrom) 社から入手できる。

溶剤 : メタノール：水 (50:50)

流速 : 1 ml / 分

検出器 : ヒューレット・パッカード HP 1047A 屈折率検出器

温度 : 周囲温度

式（I）および式（V）の化合物の保持時間は、それぞれ 31.0 分および 35.5 分であった。

実施例 4

イソプロピリデン誘導体（I）およびそのジアステレオ異性体（V）の製造

式（III）（R = t - ブチル）、式（IV）（R = t - ブチル）の化合物、および式（II）（R = t - ブチル）の化合物の生物還元で得た粗生成物の試料を、乾燥アセトン中で触媒用メタンスルホン酸の存在下に 2, 2 - ジメトキシブロバンとの反応により、対応するイソプロピリデン誘導体に変換した。典型的な反応では、生物還元で得た粗生成物 3 g を、メタンスルホン酸 (5 μl) を含有する乾燥アセトン (5 ml) 中において周囲温度で 2 時間、2, 2 - ジメトキシブロバン (7 ml) と反応させた。次いでこの溶液を 15 ml の 2% w/v 炭酸水素ナトリウム水溶液に注入し、さらに 5 分間攪拌した。得られた混合物を 30 ml の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出液を分離し、15 ml の n - ヘキサンと混和し、混和した有機抽出液を 30 ml の蒸留水で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空蒸留により溶剤を除去して濃いオレンジ色の油を得

た。これは冷却すると凝固した。

実施例 5 ~ 1 3

種々の pH、温度、通気条件および発酵方式での式 (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物の製造

実施例 5 ~ 1 3 は、Pichia angusta NCYC R320をそれぞれの場合 1.0 ~ 1.5 g / L の初期乾燥細胞重量で用いて、式 (III) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物を式 (II) ($R = t - \text{ブチル}$) の化合物から製造する方法の操作を示す。この方法は、表 3 に示した点以外は実施例 3 の記載に従って実施された。

表 3 に示した条件下で本方法を操作した結果を表 4 にまとめた。

実施例 1 3 に詳述した条件下で本方法を操作することにより得られた反応プロファイルを図 1 に示す。この場合の初期乾燥細胞重量は 1.2 . 6.7 g / L であった

表 3

実施例	pH	温 度 (°C)	通気 (vvm)	補給式バッチ/ バッチ培養
5	5.5	28	1	バッチ
6	5.5	34	1	バッチ
7	5.5	40	1	バッチ
8	5.5	28	0.1	バッチ
9	6.5	28	1	バッチ
10	4.5	28	1	バッチ
11	4.5	34	1	バッチ
12	5.5	28	1	補給式バッチ
13	4.5	28	1	補給式バッチ

vvm は、空気の容量（標準温度および標準圧力で測定）/ 培地の容量 / 分を意味する。

表 4

実施例 1 4

式 (III) ($R = t$ -ブチル) の化合物の解明

実施例 5 に記載した方法の操作で得た粗生成物 (III) ($R = t$ -ブチル) を
以下の方法でそのイソブロピリデン誘導体 (I) に変換した。

実施例	反応時間 (時間)	(II)から (III)への 転化率(%)	(II)から(III)へ の還元の比速度 ($g \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1} g^{-1}$) 乾燥細胞重量)	(III)の濃度 (g/L)	単離した (III)の 収率(%)	(I):(V) の比率
5	44	85	0.022	12.3	87	>166:1
6	22	83	0.027	2.62	ND	>64:1
7	47	57	0.052	6.1	85	>86:1
8	52	71	0.025	7.1	88	>71:1
9	24	79	0.032	4.65	ND	>85:1
10	49	93	0.015	11.3	84	>110:1
11	25.5	ND	0.018	1.98	ND	>63:1
12	41	84	0.037	10.95	84	>92:1
13	48	79	0.030	16.96	91	>172:1

* 化合物(V)は、調製したいずれの試料中にも検出されなかった。結果は化合物(V)の検出限界を基準として、実施例3に記載したHPLC条件を用いて算出された。
ND 測定されなかった。

粗生成物 (145 g; 65 g, 0.28 mol の III を含有) を、マグネチックスター ラーを備えた 1 L の丸底フラスコに装入した。このフラスコに乾燥アセトン (200 ml)、2,2-ジメトキシプロパン (294 ml, 2.39 mol) およびメタンスルホン酸 (1.5 ml) を添加した。少量の試料を湿った pH 指示紙片にスポットすることにより溶液の pH を検査し、それが酸性であることを確認した。反応混合物を周囲温度で攪拌し、実施例 3 に記載した方法を用いる HPLC により (III) の消失を監視した。反応は 3 時間で完了し、この時点で 550 ml の 2% w/v 炭酸水素ナトリウム水溶液を添加した。上記に従って pH を再検査して、7~9 の範囲内であることを確認した。混合物を分液漏斗に移し、400 ml の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチルを除去し、水相をさらに 200 ml の酢酸エチルで再抽出した。酢酸エチル抽出液を合わせ、1 L の n-ヘキサンを添加した。この合わせた酢酸エチルとヘキサンの溶液を 1 L の蒸留水で 3 回洗浄し、有機相を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶剤を真空蒸留により除去すると赤色の油が得られ、これは放置すると凝固した。

このイソプロピリデン (I) を n-ヘキサンから結晶化し、n-ヘプタンから再結晶して、白色の結晶質生成物を 81% の収率で得た。このイソプロピリデン (I) は化学的純度 98.65% であり、化合物 (II)、(III) および (V) ($R = t$ -ブチル) を含有せず、赤外分光法および $250 \text{ MHz} {^1\text{H}}$ NMR 分光測定法のいずれによっても (I) の基準試料と区別できなかった。

参考：

A T C C アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、

123031 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA

C B S セントラル・ビューロー・ポール・シンメル・カルチャーズ、

Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherland

D S M ドイッチュ・サムルング・フォン・ミクロオルガニスメン・ウント
・ツェルカルチュアレン社、

Mascheroder Weg 1b, D-330 Braunschweig, Germany

N C Y C ナショナル・コレクション・オブ・イースト・カルチャーズ・インステ

イ チ ュ ー ト・オ ブ・フ ォ ド・リ サ ーチ、ノルウ ィッヒ・ラボラト リー、

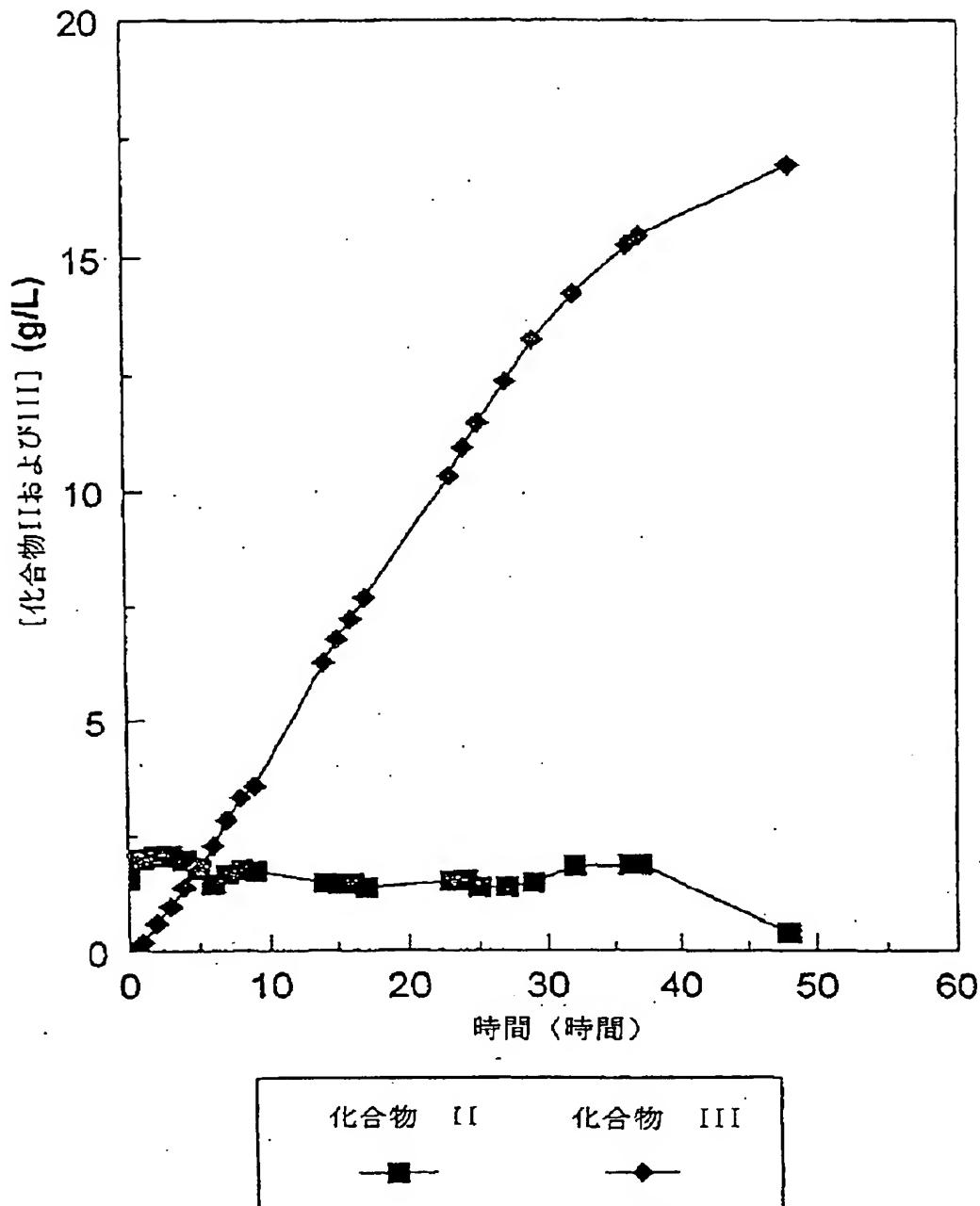
Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA

B P C C ゼネカ社、バイオプロダクツ・カルチャ -コレクション、

(一般には入手できない)

【図 1】

FIGURE 1 of 1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/GB 96/01422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12P41/00 C12P13/00 //C12P7/62,C07C255/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12P C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 5, 31 January 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 52720, PATEL, RAMESH N. ET AL: "Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl ester" XP002016585 see abstract & ENZYME MICROB. TECHNOL. (1993), 15(12), 1014-21 CODEN: EMTED2; ISSN: 0141-0229, 1993, --- EP,A,0 569 998 (SQUIBB, E. R., AND SONS, INC., USA) 18 November 1993 see claims ---	1
Y	EP,A,0 569 998 (SQUIBB, E. R., AND SONS, INC., USA) 18 November 1993 see claims ---	1 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in contact with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 1996

Date of mailing of the international search report

05.11.96

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax. (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Label	Serial Application No
PCT/GB 96/01422	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. BIOTECHNOL. (1994), 33(3), 283-92 CODEN: JBITD4; ISSN: 0168-1656, 1994, XP002016583 ZELINSKI, THOMAS ET AL: "purification and characterization of a novel carbonyl reductase isolated from Rhodococcus erythropolis" see the whole document ---	1
Y	TETRAHEDRON (1995), 51(3), 687-94 CODEN: TETRAB; ISSN: 0040-4020, 1995, XP002016584 NAKAMURA, KAORU ET AL: "Mechanistic study for stereochemical control of microbial reduction of alpha.-keto esters in an organic solvent" see the whole document ---	1
Y	US,A,5 155 251 (BUTLER DONALD E ET AL) 13 October 1992 see claims; example 2 ---	1
Y	EP,A,0 330 172 (WARNER LANBERT CO) 30 August 1989 see page 42; example 3 see claims -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inventor's Application No
PCT/GB 96/01422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0569998	18-11-93	US-A-	5324662	28-06-94
		CA-A-	2094191	16-11-93
		JP-A-	5030783	08-02-94
-----	-----	-----	-----	-----
US-A-5155251	13-10-92	AU-B-	667320	21-03-96
		AU-A-	2764192	03-05-93
		CA-A-	2116973	15-04-93
		EP-A-	0643689	22-03-95
		FI-A-	941632	08-04-94
		JP-T-	7500105	05-01-95
		NO-A-	941280	08-04-94
		PT-A-	100943	29-10-93
		WO-A-	9307115	15-04-93
		ZA-A-	9207793	11-04-94
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0330172	30-08-89	US-A-	5003080	26-03-91
		AT-T-	109777	15-08-94
		AU-B-	634689	25-02-93
		AU-A-	1601792	09-07-92
		AU-B-	635171	11-03-93
		AU-A-	1601892	09-07-92
		AU-A-	3349689	06-09-89
		CA-A-	1330441	28-06-94
		DE-D-	68917336	15-09-94
		DE-T-	68917336	01-12-94
		EP-A-	0448552	02-10-91
		ES-T-	2058356	01-11-94
		FI-B-	94958	15-08-95
		FI-A,B,C	941550	05-04-94
		IE-B-	63994	28-06-95
		JP-T-	3502798	27-06-91
		NO-B-	177566	03-07-95
		NO-A,B,C	941725	27-09-90
		NO-A,B,C	943057	27-09-90
		NO-A-	951075	27-09-90
		NO-A-	963245	27-09-90
		PT-B-	89774	31-03-94
		US-A-	5245047	14-09-93
		US-A-	5280126	18-01-94
		WO-A-	8907598	24-08-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Index and Application No
PCT/GB 96/01422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0330172		US-A- 5124482	23-06-92
		US-A- 5149837	22-09-92
		US-A- 5216174	01-06-93
		US-A- 5097045	17-03-92

フロントページの続き

(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E,
D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L
U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F
, C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E,
S N, T D, T G), A P (K E, L S, M W, S D, S
Z, U G), U A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D
, R U, T J, T M), A L, A M, A T, A U, A Z
, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C Z,
D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, H U, I
L, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L K
, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K,
M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R
U, S D, S E, S G, S I, S K, T J, T M, T R
, T T, U A, U G, U S, U Z, V N